Parque Científico • Universidad de Valencia • C/Catedrático Agustín Escardino 9
46980 Paterna (Valencia) • Tel. 96 321 23 40 • Fax: 96 321 23 41 • www.imegen.es

instituto de medicina genómica
imegen

IMG-156

imegen®-HBB

Análisis genético molecular del gen *HBB* mediante secuenciación

1. Descripción

La Beta Talasemia (MIM #141900) se hereda siguiendo un patrón autosómico recesivo y está asociada a mutaciones en el gen HBB localizado en 11p15.5.

Mediante el uso del set **imegen®-HBB** podrá realizar un estudio molecular para el análisis de pequeñas deleciones/inserciones y mutaciones puntuales en la región codificante, los sitios de splicing y las regiones reguladoras (5´UTR y 3´UTR) del gen HBB. Este estudio no permite detectar grandes deleciones/duplicaciones.

2. Componentes y almacenamiento del set

Este set contiene reactivos suficientes para la realización de 24 determinaciones.

REACTIVOS	Color	Cantidad	Conservación
Master-Mix HBB	Disco amarillo	3 x 350 µl	-20ºC
Taq HBB	Tapa amarilla	10 µl	-20ºC
PCR-HBB (Ex 1-2 y Ex 3)	Disco verde	66 µl	-20ºC
Sec F-HBB (Ex 1-2 y Ex 3)	Disco azul	75 µl	-20ºC
Sec R-HBB (Ex 1-2 y Ex 3)	Disco rojo	75 µl	-20ºC

3. Preparación de las reacciones de amplificación

En los tubos de PCR-HBB que incluye el set **imegen®-HBB** se han incluido los cebadores necesarios para realizar las reacciones de amplificación. Se deben realizar dos amplificaciones por cada muestra, una para la amplificación conjunta de los exones 1 y 2 y otra reacción de PCR para la amplificación del exón 3.

Para estimar la cantidad de reactivos necesaria, se debe tener en cuenta el número de muestras y controles a analizar simultáneamente. Recomendamos realizar los cálculos, considerando una reacción más, o bien, incrementando un 10% el volumen de cada reactivo.

1. Descongelar los reactivos y el ADN de las muestras. Dar un vórtex a cada uno de los reactivos y mantener en frío.
2. En dos tubos de 1,5 ml preparar los mix de PCR con las siguientes cantidades:

Reactivos	Exones 1-2	Exón 3
Master-Mix HBB	19,9 µl	19,9 µl
Taq-HBB	0,1 µl	0,1 µl
PCR-HBB Ex 1-2	2,5µl	-
PCR-HBB Ex 3	-	2,5µl

3. Dispensar en tubos de 0,2 ml, o en una placa de PCR, 22,5 µl de cada uno de los másters de PCR
4. Añadir 2,5 µl de ADN (10 ng/µl) a cada una de las reacciones

Inscrita en el Registro Mercantil de Valencia, Tomo 9066, Libro 6350, Folio 80, Hoja nº V-134945, Insc. 1ª C.I.F. B98165723

4. Programa de amplificación

Someter las reacciones de amplificación al siguiente programa de amplificación:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95ºC	10 minutos	1
95ºC	30 segundos	40
55ºC	30 segundos	
72ºC	45 segundos	
72ºC	10 minutos	1
4ºC	∞	

Posteriormente se deben analizar, mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, los productos de PCR para verificar la presencia de amplificados en todos los exones y la ausencia de amplificación en los controles negativos.

5. Secuenciación de los productos de PCR

Antes de realizar la secuenciación es necesario realizar la purificación de los productos de PCR. Esta purificación se puede realizar empleando el siguiente protocolo:

1. Añadir 5 µl de cada uno de los amplificados que se vaya a purificar en una placa limpia.
2. Añadir 2 µl de ExosapIT a cada pocillo.
3. Incubar las muestras 15 minutos a 37ºC y 15 minutos a 80ºC en un termociclador.

A partir de los productos de PCR purificados se preparan dos reacciones de secuenciación: una con el cebador directo (Sec F-HBB) y la otra con el reverso (Sec R-HBB). El set imegen®**-HBB** incluye los cebadores necesarios para realizar las reacciones de secuenciación.

6. Electroforesis capilar

Una vez purificadas, las reacciones de secuenciación deben ser sometidas a electroforesis capilar. Dependiendo del modelo de secuenciador utilizado, se empleará el polímero recomendado por el fabricante. Para programar las condiciones de electroforesis se tendrá en cuenta que el tamaño de los amplificados es de 823 pb y 528 pb.

10. Control de calidad

Todos los productos comercializados por el Instituto de Medicina Genómica son sometidos a un riguroso control de calidad. El set imegen®**-HBB** ha superado todas las pruebas de validación internas, que garantizan la fiabilidad y reproducibilidad de cada ensayo.

12. Garantías y responsabilidades

El Instituto de Medicina Genómica le garantiza que todos sus productos están libres de defectos, tanto en los materiales empleados como en su proceso de su fabricación. Esta garantía se hace extensible hasta la fecha de caducidad del producto, siempre que se mantengan las condiciones de conservación especificadas en este Manual. **Nuestros productos están diseñados para uso en investigación.** El usuario de los productos es responsable de validar la utilidad de los protocolo propuestos por el Instituto de Medicina Genómica. Dichos protocolos se consideran únicamente una guía. El Instituto de Medicina Genómica no le ofrece ninguna otra garantía, expresa o implícita, que se extienda más allá del funcionamiento correcto de los componentes de este set. La única obligación del Instituto de Medicina Genómica, respecto de las garantías precedentes, será la de reemplazar los productos, o bien devolver el precio de la compra de los mismos, a voluntad del cliente, siempre y cuando se pruebe la existencia de un defecto en los materiales, o bien en la elaboración de sus productos. El Instituto de Medicina Genómica no será responsable de ningún daño, directo o indirecto, que resulte en pérdidas económicas o en daños que pudieran producirse por el uso de este producto por parte del comprador o usuario.

13. Servicio de atención al cliente

Para cualquier consulta sobre las aplicaciones de este producto o sobre sus protocolos, puede contactar con nuestro Departamento Técnico:

Teléfono: 963 212 340
Mail: info@imegen.es

Inscrita en el Registro Mercantil de Valencia, Tomo 9066, Libro 6350, Folio 80, Hoja nº V-134945, Insc. 1ª C.I.F. B98165723